

⑨ 日本国特許庁(JP) ⑩ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報(A) 平1-250397

⑤ Int. Cl. ⑥ 特 願 昭63-268356 ③ 公開 平成1年(1989)10月5日
C 07 K 3/00 8829-4C
A 61 K 39/29
C 07 K 3/12 8318-4H
15/04 8318-4H
15/14
C 12 P 21/00 B-6712-4B 審査請求 未請求 請求項の数 8 (全10頁)

⑭ 発明の名称 組換え体肝炎抗原の精製方法
⑮ 特 願 昭63-268356
⑯ 出 願 昭63(1988)10月26日
優先権主張 ⑰ 1987年10月26日 ⑱ 米国(U S) ⑲ 113,583
⑳ 発 明 者 シゲコ ヤマザキ アメリカ合衆国, 19440 ペンシルヴァニア, ハットフィールド, シュワブ ロード 1279
㉑ 出 願 人 メルク エンド カム アメリカ合衆国, ニュージャージー, ローウェイ, イース
パニー インコーポレ ト リンカーン アヴェニュー 126
ーテッド
㉒ 代 理 人 弁理士 岡部 正夫 外3名

明細書の序言(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称 組換え体肝炎抗原の精製方法
2. 特許請求の範囲
 1. 組換え体発現系由来の沈降部分的精製組換え体肝炎抗原より組換え体 B 型肝炎表面抗原の可溶化方法において
 - (a) 沈降部分的精製組換え体 B 型肝炎抗原、あるいはその当該抗原の一部分を有する調製物を、当該調製物を可溶化するのに効果的な還元剤の存在下で若干量の変性剤で処理し、及び
 - (b) 変性剤及び還元剤を除去し、実質的に可溶化した部分的精製組換え体肝炎抗原あるいはその当該抗原の一部分を有する調製物を作成することよりなる方法。
 2. 部分的精製組換え体肝炎抗原あるいはその当該抗原の一部分を有する物が請求項 1 記載のステップ(a)に先だち
 - (a) rHbsAg あるいはその部分的抗原を発現している酵母細胞の増殖、

- (b) 当該細胞の捕集、
- (c) 当該細胞の破壊及び細胞片の除去、部分的精製 rHbsAg の精製というステップよりなる請求項 1 記載の方法。
3. 部分的精製組換え体肝炎抗原あるいはその当該抗原の一部分を有する物が請求項 1 記載のステップ(a)に先だち
 - (a) rHbsAg あるいはその部分的抗原を発現している酵母細胞を増殖させ、
 - (b) 当該細胞を捕集し、
 - (c) 当該細胞の破壊及び細胞片の除去、部分的精製された粗抽出物を作成し、及び
 - (d) 融合シリカに対する粗抽出物の吸着、溶出による部分的精製 rHbsAg の作成というステップよりなる請求項 1 記載の方法。
4. 部分的精製組換え体肝炎抗原あるいはその当該抗原の一部分を有する物が請求項 1 記載のステップ(a)に先だち
 - (a) rHbsAg あるいはその部分的抗原を発現している酵母細胞を増殖させ、

特開平1-250397(2)

- (b) 当該細胞の捕集、
- (c) 当該細胞を破壊し及び細胞片を除去し、部分的精製された粗抽出物を作成し、
- (d) 分析用シリカに対して粗抽出物を吸着させ、溶出による部分的精製溶出液を調製し、及び
- (e) 溶出液を疎水性クロマトグラフィーにかけ部分的精製rHbsAgを作成するというステップよりなる請求項1記載の方法。
- 5. 変性剤が尿素である請求項1あるいは2あるいは3、あるいは4記載の方法。
- 6. 還元剤がジチオスレイトールである請求項1あるいは2あるいは3あるいは4記載の方法。
- 7. 変性剤が尿素、及び還元剤がジチオスレイトールである請求項1あるいは2あるいは3あるいは4記載の方法。
- 8. 尿素の最終濃度が約4M及びジチオスレイトールの最終濃度が約5mMである請求項7記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

本出願は、ケース番号169981A、米国出願番号第636,514号(1984年8月1日)、ケース番号17475、米国出願番号第019,820号(1987年2月27日)及びケース番号17537に関連するものである。

B型肝炎表面抗原は、それ以後のB型肝炎ウィルスの感染による病理学的影響に対する免疫というものを与える糖タンパク-タンパク複合体をよく生じる。ワクチン接種を目的とした抗原の完全、迅速かつ安価なる製造に対する供給源はこれまで通常22nmの粒子を形成している、必要な抗原を大量に作り出していた患者の血清あるいは血漿に限られていた。しかし組換えDNA技術の出現に伴ない、表面抗原をコードしているDNAが酵母、大腸菌あるいはその他の細胞系へ挿入され、発現される様になった。得られるポリペプチド産物は挿入DNAの発現に使用される宿主あるいは細胞系と同様に挿入されるDNAの構築によって実質的に変化するものである。

HBVウィルス粒子は、コアタンパク及びエンベロープあるいは表面("S")タンパクなる2種類の構造タンパクグループより構成されている。ウィルスの主要な表面抗原であるという事に加え、すなわちデーン粒子、"S"タンパクはオーストラリア抗原の唯一の構成要素であり、あるいは22nmの粒子である。"S"タンパクは血清型に依存し、389から400個のアミノ酸をコードしているラージオープンリーディングフレーム(ORF)からの翻訳生産物である。このORFは3つの領域に分けられており、それぞれが、インビボにおける翻訳開始部位となる機能を持つATGコドンより、始まっている。これらの領域はpre-S1(108から119個のアミノ酸)、pre-S2(55個のアミノ酸)及びS(226個のアミノ酸)として、遺伝子の5'から3'への配列に従って表示されている。このORFからの6個の産生タンパクを以下に成分と伴に示す。

- 1) gp42(42,000ダルトンの糖タンパク) = pre-S1/S2/S (これは pre-S1は pre-S2に、

又 pre-S2はさらにSへと隣接している事を意味するものである)。

- 2) p39(p=タンパク) = pre-S1/S2/S、
- 3) gp36 = pre-S2/S (グリコシレーション部位を2つ持つ)。
- 4) gp33 = pre-S2/S (グリコシレーション部位を1つ持つ)。
- 5) gp27 = S (グリコシレーション部位を1つ持つ)。
- 6) p24 = S。

HBVデーン粒子中においては、6個のタンパクすべてがほぼ等モル存在している。しかし22nm粒子中においては、4個の小さなタンパクがほぼ等モル存在しているだけで、gp42及びp39については、せいぜい粒子あたり1モルか2.3モルにしかすぎない。pre-S1及びpre-S2領域はS領域の分泌を促進させる機能をもっている。このタンパクに関する根本的特性についての再考のために、次の文献がある。チオライス、ビー、(Thioilais, P.)等、サイエンス、第213巻、第406

特開平1-250397(3)

頁、(1981)、及びミリチ、ディー、アール、(Milich, D.R.)等、ブ洛克、ナトル、アカド、サイ、(Proc. Natl. Acad. Sci.)、第82巻、第8168頁(1985)。

B型肝炎抗原の pre-S2領域は約55AA(アミノ酸)残基より構成されている。この存在がインビボにおけるSタンパクの抗原決定基よりも免疫原性のある主要な抗原決定基を提供するものであり、ニューラス、エー、アール、(Neurath, A.R.)等、サイエンス、第224巻、第392頁(1984)、ニューラス、エー、アール、等、ネイチャー、第315巻、第154頁(1985)、及びミリチ、ディー、アール、等、上記記載、などに報告されている。pre-S2ポリペプチドは重合ヒト血清アルブミン(pHSA)に対するリセプター様特性を持ち、pHSAと結合すると知られている肝臓細胞が所有している特性でもあり、マチダ、エー、(Machida, A.)等、ガストロエントロロジー(Gastroenterology)、第86巻、第910頁(1984)に報告されている。

また可溶化技術は迅速かつ簡便である。

組換え体形成のための供給源、たとえば酵母の構成成分は従来の供給源、たとえば血清とは異なるため、組換え体タンパクの精製には新たな方法、又は従来の方法における新たな組み合わせがしばしば必要となってくる。古典的あるいは他の通常の供給源由来のタンパクの分離に対して有効な方法についての知識やノウハウの基礎においてでは、組換え体細胞培養由来のタンパクの分離に対してどのような方法が有効であるか、予測はしにくいものである。ワクチン調製を目的とした精製過程には、その産物において、これまでとは異なった純度というものが必要であり、公知の技術では、予測しえない他の方法が必要である。同様な考え方として、米国特許第4,624,918参照。

本発明において、組換え体発現系由来の沈殿形成された部分的精製組換え体肝炎抗原より組換え体B型肝炎表面抗原沈殿形成物を可溶化する方法を示し、以下のステップより成っている。

(a) 沈降部分的精製組換え体抗原あるいはその

表面抗原中における pre-S2配列の存在は、免疫処置の目的に際して好ましい特性であることから pre-S1/S2/S タンパク及び他の異なるタンパクを発現する発現系というものが開発されている。例えば米国申請番号824,405、登録1月31日、1986、参照。

本発明の方法は沈殿形成した、B型肝炎ウイルスの組換え体表面抗原(rHbsAg)の可溶化に関するものである。部分的精製rHbsAg沈殿物は尿素及びDTTとの併用及び同時使用による処理で可溶化される。酵母及びその他の発現系由来のrHbsAg精製方法において、沈殿物形成あるいは他の不溶性物の存在が、たびたび生ずる。本発明は肝炎関連疾患に対するより良好かつ安価なワクチン製造目的のためにその様な形成された沈殿物を溶解し精製する方法を提供するものである。

部分的精製組換え体表面抗原の還元剤存在下での変性剤による可溶化についての技術点利点には高度の産製量及び精製純度の獲得が含まれている。そして、その上可溶化生成物はより安定である。

当該抗原の一部を含む調製物を当該調製物の可溶化に効果的な還元剤の存在下で、若干量の変性剤で処理する。及び

(b) 変性剤及び還元剤を除去し、実質的に可溶化した、部分的精製組換え体肝炎抗原あるいはその当該抗原の一部を含む調製物を作成する。

比活性：免疫学的に反応しうる sAgと総タンパクとの重量対重量の比率

AA	アミノ酸
DTT	ジチオスレイトール
ED ₅₀	50%有効量
EDTA	エチレンジアミン四酢酸三ナトリウム塩
L	リッター
Mr	移動度
MW	分子量
NMW	名目上の分子量カットオフ
pHSA	重合ヒト血清アルブミン
PBS	リン酸緩衝生理食塩水、0.15M NaCl を含む7mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH

特開平1-250397(4)

約 7.2

PHSF フッ化フェニルメチルスルホニル
psi 平方インチあたりのポンド
rHbsAg 組換え体 B 型肝炎表面抗原
S 表面
SDS-PAGE ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリ
ルアミドゲル電気泳動

本発明の方法には酵母抽出物由来の組換え体 B 型肝炎表面抗原 (rHbsAg) の可溶化の方法が含まれている。これらの方法は還元剤の存在下での変性剤による rHbsAg の併用処理を包含する。

本発明の新規精製方法が、組換え体 S タンパクあるいは組換え体 pre-S1/S2/S タンパクを含む、rHbsAg の発現という領域に対して適応しうる事が理解できるであろう。1つの根本的実施例として実施例1における酵母ベクターによりトランスホームされた酵母細胞より産生された rHbsAg がある。この系は S アミノ酸配列を発現する。S タンパクにおける他の変異アミノ酸配列に対する精製方法も本発明中に含まれる。本発明の過程は、

S タンパク、22nm 粒子、オーストラリア抗原、デーン粒子あるいはその他自然界に存在する肝炎表面抗原配列を持つものに対して特異的な抗体と免疫学的に反応するのならば本明細書における rHbsAg、表面抗原あるいはその部分的抗原は、保存性のある置換、欠損、あるいは他の作用を受けたものであらうと、そのアミノ酸配列中においてある種の変異を含んでいる事はよく知られている所である。

酵母による発現系の多くは、rHbsAg の供給源として明らかに適切である。実施例1におけるエス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) 発現系は単に1つの臨時的な供給源を意味するものである。その他の酵母ベクターとして、シャトルベクター、コスミドプラスミド、キメラプラスミド及び、2-ミクロン環状プラスミド由来の配列を含むベクター等を限定するものではない。種々のプロモーターや、その他の酵母における転写制御配列は、GAL 10あるいは α 接合因子を含み、表面抗原をコードしている挿入 DNA 配列の発現に使用される。

本発明の原理に従って、pre-S1/S2/S タンパク変異体と同様に S タンパク変異体をも含む、いかなる rHbsAg の精製に対して迅速かつ効果的な方法を提供する事を目的としている。例えば、pre-S1/S2/S のアミノ酸配列中における保存性のある置換 (テイラー、ダブル、アール、(Taylor, W.R.), ジェイ、モル、バイオル、(J. Mol. Biol.), 第188巻, 第233頁 (1986) の第1図において明らかにされている) というものは、一般的に本発明の原理及び実施におけるいかなる実質的あるいは新規な改良をもたらしものではない。肝炎表面抗原の保存性のある置換として知られているものについては、エルファシー、イー、(Elfassi, E.) 等、ジェイ、セオル、バイオル、(J. Theor. Biol.), 第121巻, 第371頁 (1986) 参照。また別なものとして、S, pre-S1あるいは pre-S2領域における欠損についても、一般的には本明細書中における精製方法のいかなる改良をも、必要としないであろう。もし rHbsAg、表面抗原あるいはその部分的抗原が、

サッカロミセス属にはいろいろな種があり、最も一般的に使用されるものとしてサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、あるいはパン酵母などがあり、種々の外来性ポリペプチドに関する組換え体 DNA 媒介発現における宿主として働く。しかしながらサッカロミセス属における他の種との相違関係については、あまりよく明らかにされていない。これらの種の大部分はエス・セレビシエとの交配が可能であり、エス・セレビシエが有するプロモーターと類似のあるいは同一の制御プロモーターを所有しうるものであり、GAL 10, ADH 2, GAP 及び/あるいは α 接合因子プロモーターに限定されるものではない。よって pre-S-含有ポリペプチドの発現に対して、宿主株の選択範囲をサッカロミセス属の他の種にまで広げられかつカルスベルゲンシス (*carlsbergensis*)、ウバラム (*uvaram*)、ローキシ (*rouxii*)、モンタナス (*montanus*)、クロイベリー (*kluveri*)、エロンギスポラス (*elongisporus*)、ノルベンシス (*norbensis*)、オビホルミス (*oviformis*)、及び

特開平1-250397(5)

ジアスタチカス(*diastolicus*)に限定されるものでない事は当業者にとっては明白である。

幾つかの酵母属、例えばハンゼスラ(*Hansenula*)、カンジダ(*Candida*)、トルロブシス(*Torulopsis*)、及びビヒア(*Pichia*)などは増殖に際して唯一の炭素源として、メタノールを有効に使用する、同様の代謝経路を持つ事が示されている。この代謝経路に関与している酵素であるアルコールオキシダーゼの遺伝子がビヒア・パストリス(*Pichia pastoris*)より分離されている。ビー・パストリスのアルコールオキシダーゼプロモーターが分離され、しかもメタノール誘発による発現に対して感受性である事が示されている。このような誘発可能なプロモーターは酵母中において選択性の得られないポリペプチドの発現に対して有効である。特にこのプロモーターは粒子形態をとるビー・パストリス中のS領域の誘発的発現に対するプラスミドにおいて活動的であるとされている。この所見により強調されるのは、免疫学的形態をとるSポリペプチドの組換え体DNA媒介発現に対する

宿主として機能する他の酵母属の能力である。それ故、rHbsAgの発現に対して宿主株の選択範囲をサッカロミセタシエ(*Saccharomycetaceae*)科の他の酵母属の種や、クリプトコッカシエ(*Cryptococcaceae*)科の種に至るまで広げられ、ビヒア、カンジダ、ハンゼスラ、トルロブシス、クロイベロマイセス及びサッカロミコプシス(*Saccharomycopsis*)に限定されるものでない事は当業者にとって明白である。

肝炎表面抗原の精製方法には、その表面抗原の過度の不安定性や、崩壊がつきものである。この問題点を解消する為に、溶媒に代表的な緩衝作用をもたせ、さらにPHSP及びEDTAなどの様なプロテアーゼインヒビターを含ませた。更にタンパク分解を抑える為には、すべての精製段階を約4℃において行なう事が好ましい。

本発明の過程及び手順において適切な代表的プロテアーゼインヒビターが含まれているが、金属キレート剤、重金属イオン、SH保護剤、プロテアーゼの基質様化合物、プロテアーゼ阻害ポリペ

プチドに限定されるものではない。幾つかの有効なプロテアーゼインヒビターを以下に示すと、

Ag⁺⁺、Hg⁺⁺、Cu⁺⁺ 及び他の重金属イオン

アンチスロンビンⅢ

アンチスロンビンⅢ-ヘパリン

α₁-アンチトリプシン

アプロチニン

塩基性アミノ酸

ベンズアミジン

ベスタチン

α, α'-ビビリジル、Na-フロライド

4-プロモ-フェナンスルプロマイド

ニワトリ卵白トリプシンインヒビター

キモスタチン

クエン酸

システイン

4-ジニトロフェノールリン酸ジエチル

DPP (ジイソプロピルホスフォリデート)

DTT

E-64 (ベーリンガーマンハイム)

EDTA及び他のキレート剤

ホルムアルデヒド

グアニジニウムクロライド

ヘパリン

ヒルジン

4-ヒドロキシ水銀ベンゾエート

ヨードアセトアミド

ヨード酢酸

ロイペプチン

α₂-マクログロブリン

メルカプトエタノール

p-水銀ベンゾエート

塩化水銀(Ⅱ)

α-ミクログロブリン

α-N-(p-ニトロベンジル-オキシカルボニル)-L-アルギニルクロロメチルケトン

オキサレート

ストレプトミセス(*Streptomyces*)を含む種々の供給源からのベスタチン

1, 10-フェナンスロリン

時間平1-250397(6)

2-フェナンスロリン
 フェノチアジン-N-カルボニルクロライド
 ホスフォルアミド
 PMSF
 ブリロホスフェート
 SH保護剤
 硝酸銀
 ツイブントリブシンインヒビター
 フッ化p-トルエンスルホン
 TLCK (L-1-クロロ-3-(4-トシルアミド)-
 7-アミノ-2-ヘプタノン-塩酸塩)
 トリトンX-100及び低温度における他の界面
 活性剤
 TPCK (L-1-クロロ-3-(4-トシルアミド)-
 4-フェニル-2-ブタノン)
 鶏卵由来トリブシンインヒビター
 ZPCX (ベンジルオキシカルボニル-L-フェニル
 アラニン) などがある。

上記記載のインヒビターを1つあるいは幾つか
 を含んだ緩衝液は表面抗原の精製方法における、

1つあるいは幾つかの段階で適用されうるもので
 ある。

精製

pre-S1/S2/Sタンパク、あるいはその変異
 種タンパクをコードしている発現ベクターにより
 トランスホームされた酵母細胞を増殖し、捕集し
 た。もし細胞を保存するのならば、PBSの様な
 緩衝液で細胞を洗浄し、細胞ペーストとして保存
 する。代表的な方法として、その細胞ペーストは
 液体窒素中において凍結保存される。

代表的な精製手順を以下に示す。凍結細胞ペー
 ストの1パッチを融解し、タンパク分解阻害剤を
 含む、2mM PMSF含有PBS、あるいは高張リン
 酸緩衝液などの緩衝液により懸濁する。細胞は機
 械的に破砕した方が好ましい。細胞破砕の際のゆ
 るやかなビーズ破壊法は大量処理には不適当であ
 る。細胞破壊器による破砕が、その迅速な操作の
 ために最も好ましい方法である。

酵母細胞破壊により粗抽出を行なう。この時に
 必要な事は、それ以後の精製段階における機械的

障害を避ける為に、抽出液中の細胞片を除去する
 という事である。約4,400xg, 5分間の遠心が通
 切であるとされているが、異なった遠心速度及び
 遠心時間でも、同様に溶かして精製するという方
 法においては、可能性を持ち簡単に実施されると
 いう事は、たやすく判断しうるものである。pre-
 Sポリペプチドエピトープの存在はこれらのエ
 ピトープが重合ヒト血清アルブミン (PHSA) に結
 合するという事よりHBV表面抗原に特異的な標
 識抗体を用いたRIAサンドイッチアッセイによ
 り確認する事が出来る。精製の次のステップは、
 粗抽出から4,400xg, 5分間の遠心で細胞片を除
 去し、残った4,400xg上清液についてさらに精製
 が行なわれる。

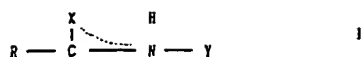
可溶化

細胞片を粗抽出物より除去した後、可溶化反応
 を行なう。細胞片除去後ならいかなるステップに
 おいても可溶化反応は実施しうるものである。例
 えば、尿素-DTT処理による可溶化はシリカゲ
 ルに対する吸着、溶出による付加的ステップある

いはその他の付加的ステップとして疎水クロマト
 グラフィーの操作の後でも遂行しうるものである。
 幾つかの点においてrHbsAgの可溶化が行なわれる
 限り、精製方法におけるこれら及びその他のバリエ
 ーションというものは本発明に含まれるもので
 ある。しかしながら、精製方法における不溶性沈
 殿物の早期の除去というものは精製方法の操作性
 を高めるので、細胞片除去後、直ちに可溶化反応
 を行なう事が望ましい。

可溶化は1つあるいは数種の変性剤及び1つあ
 るいは数種の還元剤、あるいは両者の混合液の存
 在下で行なわれる。好ましい試薬の選択としては
 尿素及びジチオスレイトール (DTT) であり、
 濃度範囲はそれぞれ約1M-8M及び1-10mM
 の間である。最も好ましい可溶化のための溶液は約
 4Mの尿素及び約5mMのDTTを含むものである。
 緩衝液及びプロテアーゼインヒビターは必要に応
 じて加えられる。

一般的に、構造式1なる変性剤はどれも皆、可
 溶化の目的には適当かつ便利なものである。



式中 R はアミノ、低級アルキルチオ、低級アルキルオキシあるいは硫黄、

X はアミノ、硫黄あるいは酸素、及び

Y は水素あるいはアミノである。

この構造式には尿素も含まれ、式中 R はアミノ、X は O 及び Y は H である。別な可溶化反応手順において使用されるその他の変性剤として界面活性剤をも含むが、ノノキシノール系、オクトオキシノール系、ポリオキシエチレンアルコール系、ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノオリエート系、デオキシコレート、あるいはオクチルグルコピラノシドあるいは類似物に限定されるものではない。両極性界面活性剤も同様に有効かつ適切な薬剤である。

rHbsAg の可溶化に有効な還元剤はチオール試薬であり、これはタンパク rHbsAg の S H 基を実質的に修飾しない物である。システイン、ホモシスチ

ガロース、ヘキシルアガロース、オクチルアガロースあるいはフェニルアガロース、及び

(c) 不必要な膜結合タンパクを遊離する溶媒あるいは試薬による選択的抽出、その次に膜結合 rHbsAg を遊離するその他の溶媒あるいは試薬による選択的抽出。他の目的の為に他の溶媒あるいは試薬による抽出は別のステップにおいても必要になるであろう。

(d) 沈殿法は rHbsAg の単離にとっては有効な他のステップの 1 つである。沈殿法は硫酸アンモニウムの様な塩の使用あるいは等電点沈殿である pH 勾配により行われる。他の方法として

(e) 標準的方法によるクロマトグラフィー、ペーパー、薄層、ゲル、分子ふるい、分子排斥、イオン交換、リガンドアフィニティー、イムノアフィニティーあるいは電気泳動。

(f) 二層分配抽出による溶媒分画、例えば PEG とデキストラン [アンダーソン、イー、(Anderson, E.) 等、アン、エヌ、ワイ、アカド、サイ、(Ann. N. Y. Acad. Sci.), 第 4 1:3 巻、第

特開平 1-250397 (7)

イン、β-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、ジチオエリスリトール及び重亜硫酸ナトリウムはチオール試薬のカテゴリーに入れられる試薬の幾つかである。一方、エルマン (Ellman's) 試薬及び水素化ホウ素ナトリウムは、それぞれ可溶化反応には強すぎる試薬である。つまり、それらの試薬と rHbsAg との反応は、元通りに再配列する事の出来ない実質的な不可逆修飾した生成物を生じ、rHbsAg におけるシステイン残基間に新たなジスルフィド結合をもたらすからである。

付加的ステップ

組換え体タンパクの精製に普通に用いられる、その他の従来のあるいは既知のステップが、rHbsAg 精製方法に付け加えられる。これらのステップを以下に記載するが、それに限定されるものではない。

- (a) 固相上、例えばシリカゲル、リン酸カルシウム活性炭、あるいはセライトアルミナ、における選択的吸着あるいは分離。
- (b) 疎水性クロマトグラフィー、例えばブチルア

115 頁 (1983))。

- (c) 透析、ウルトラフィルトレーション (Ultra filtration)、あるいはダイヤフィルトレーション。
- (d) 密度勾配遠心法。
- (e) エレクトロフォーカシング法。
- (f) フリーズドライ、凍結乾燥法。あるいは
- (g) 結晶化法。

このリストは決してすべての方法を述べたものではない。また記載されている順番は精製における好ましい順に示してあるわけではない。rHbsAg の精製で好結果を得る為にはステップ (a) - (g) のどれかあるいはすべてを行なう事や、しかも原理的に、上記記載にもある様に可溶化は、いかなる場合においても付加的ステップとして取り扱われるであろう事は、よく知られているところである。

実施例中における以下の材料は市販品より入手した。尿素及びグアニジン、HCl ; シュワルツ / マン バイオテック (Schwartz/Mann Biotech) ; トリトン X-100、フィッシャー サイエンテ

ィフィック カンパニー (Fisher Scientific Company): ジチオスレイトール、バイオラッド。

本出願における全操作において、糖タンパク質は過ヨウ素酸-シッフ塩基法により測定される (ネビーレ、ディー、エム、(Neville, D. M.) 等、メソッズ イン エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 第32巻, 第92頁 (1974))。タンパク濃度はSDS-ローリー法 (例えば、ローリー、オー、エッチ、(Lowry, O. H.) 等、ジェイ、バイオル、ケム (J. Biol. Chem), 第193巻, 第265頁 (1951))、またはクーマジ-ブルー結合法 (例えば、ブラッドフォード、エム、エム、(Bradford, M. M.)、アナル、バイオケム、(Anal. Biochem.), 第72巻, 第248頁 (1976)) などにより測定される。

免疫化学的試験は精製されたロットに対して以下の方法で行なわれる。重合ヒト血清アルブミン (pHSA) に対する結合はバレンズエラ (Valenzuela) 等、バイオテクノロジー (Biotechnology), 第3巻, 第317頁 (1985) の報告に従がっ

(ADH) プロモーターの代わりにグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAP) プロモーターを保有しているものである。細胞はカーティ (Carty) 等、第84回ミーティング、3月12日、1984、セントルイス、モー (MO)、抜料030、第194頁の記述に従がい増殖し、捕集した。細胞ペーストを、等容量の高張リン酸緩衝液 (0.1 M リン酸ナトリウム pH 7.2, 0.5 M NaCl) で懸濁。フッ化フェニルメチルスルホニル (イソプロパノール中で 0.2 M) を最終濃度 2 mM になる様に加え、細胞を15分間、10,000psigのラボラトリーホモジナイザーに7回から9回かけ、細胞を破砕し粗抽出物を獲得する。粗抽出物 (32-70 mgタンパク / mL) を 0.1 % トリトン X-100 (ローム アンド ハース (Rohm and Haas)) を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 4 容量で希釈する。細胞片を連続遠心にかけ除去し、上清溶液をホローファイバーユニットで5倍に濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水 (7mM リン酸ナトリウム, pH 7.2, 0.15 M NaCl)

特開平1-250397 (8)

で行なう。免疫化学的決定基はAUSRIA (商標名) II-125 (アボット ラブス (Abbott Labs))、及びAUSAB (商標名) (アボット ラブス) などを含む、いろいろな従来方法により測定される。生物学的活性はマウスにおけるポテンシー試験により測定される。

実施例1

部分的精製rHbsAgの調製

部分的精製組換え体表面抗原のサンプルをワンプラー、ディー、イー、(Wampler, D. E.) 等、プロク、ナトル、アカド、サイ、(Proc. Natl. Acad. Sci.), 第82巻, 第6830頁 (1985) の方法に従がい、ブチル-アガロースの疎水クロマトグラフィーを含むステップにより実質的に精製し、ブチル-アガロース生成物として獲得した。これらの方法を以下に示す。

2つの酵母株をrHbsAgの供給源として使用。

1つはバエンズエラ等、ネイチャー、第298巻, 第347頁 (1982) に記載されているものであり、もう1つは、アルコールデヒドロゲナーゼ

5容量を用いてダイヤフィルドレーションする。トリトン X-100 は XAD-4 ビーズカートリッジの使用により除去する (ローム アンド ハース, (Rohm and Haas))、チーサム、ビー、エス、ジェイ、(Cheatham, P. S. J.)、アナル、バイオケム、(Anal. Biochem), 第92巻, 第447 (1979))。HbsAgを融合シリカに対する50 mMホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 8.7での吸着、溶出により部分的精製する (ピロット、ジェイ、(Pillot, J.) 等、ジェイ、クリニ、ミクロバイオル (J. Clin. Microbiol.) 第4巻, 第205頁 (1976))。溶出液を11,000xg, 35分間、4℃の遠心にかけ清澄化し、いつもの通りに4℃に保存。この段階における不溶性沈殿物の除去のために8000xg, 4分間、遠心にかけ、得られた清澄化生成物をブチルアガロースにおける吸着により更に精製し、溶出液においてブチルアガロース生成物を獲得する

実施例2

可溶性反応

特開平1-250397 (9)

ブチル-アガロース生成物を尿素-DTTあるいはKSCNあるいはその両者を用いて次の様に処理する。

- (a) 尿素-DTT処理。実施例1におけるブチル-アガロース生成物を4 M尿素及び5 mM DTTを用いて、15-20分間、4℃でインキュベーションする。抗原より分離してきた不純物をホローファイバー膜(100,000 NMW, 0.6 ft.², 5 psi)上で5容量の2 M尿素を含む2 mM DTT、次に10容量のPBSの順に使用したダイアフィルトレーションを行ない抗原と区別し、尿素-DTT処理済み保留生成物を獲得。
- (b) KSCN処理。実施例1におけるブチル-アガロース生成物、あるいは本実施例中のステップ(a)における尿素-DTT処理済みサンプルを3 M KSCNを含むPBSを用いて、16時間、4℃でインキュベーションする。抗原より分離してきた不純物をホローファイバー膜(100,000 NMW, 0.6 ft.²)上で5容量の3 M KSCNを含むPBS、次に10容量のPBSの順に使用した

ダイアフィルトレーションにより除去し、KSCN処理済みサンプルとして獲得。

尿素-DTTあるいはKSCNあるいは両者により処理されたサンプルの電子顕微鏡観察は、22 nm粒子としての典型的な形態を持っている事を示した。更にこれらのサンプルについて、マウスポテンシールテストによる免疫学的能力の解析を行なった。

マウスポテンシールテストを以下の過程により測定した。試験用の抗原サンプルを0.22 μm膜で濾過滅菌し、サンプル(20 μg / mlタンパク)を1:4,000ホルマリン、72時間、37℃で処理して調製した。ホルマリン-処理サンプル各1 mlに5.44%の滅菌硫酸アルミニウムカリウム溶液0.085 mlを加え攪拌し、この混合液のpHを1 N NaOHで6.75に調整してこのホルマリン-処理サンプルをアラムに吸着させる。攪拌2時間後、懸濁液を1000 kg、10分間の遠心にかける。上清液をアラム沈殿物よりデカント除去した。アラム-吸着rHbsAgを生理的食塩水で最初の容量に

もどし、再懸濁し、チメロサルを1:20,000の濃度で加えた。調製サンプルは、アラムブラシボ-で希釈あるいは希釈なしで、マウスで試験をし、それぞれ0.025、0.006及び0.0016 μg / mlとする。各調製サンプルあるいはアラムブラシボ-1 mlをそれぞれ10匹のマウスに腹腔内接種する。28日後に個々のマウスから採血し、抗体力価をAUSAB ラジオイミュノアッセイにより測定する。データーを解析し、サブユニットHbsAgの異なった用量に対する抗体陽率を決定した。そのデーターに基づき用量に対して実測プロビットをプロットし、最小二乗法による回帰式より推定プロビットを求めED₅₀用量(μg)を求める。

マウスポテンシールテストの結果を以下の表においてまとめた。尿素-DTT処理は実質的にマウスポテンシーを増進させた。

表
rHbsAgのマウスポテンシールテスト

試料 番号	出発材料	処 理		マウスポテンシール ED ₅₀ (μg)
		尿素-DTT	KSCN *	
87706	ブチル-アガロース生成物	なし	なし	1.01
		なし	あり*	0.74
		あり*	なし	0.44
		あり*	あり	0.82
87708	ブチル-アガロース生成物	あり	あり	0.57
		あり	あり	0.35
87708	ブチル-アガロース 65 分 (炭素) 百分 *	なし	あり	1.36
		あり	なし	1.11
87712	ブチル-アガロース生成物	あり	あり	0.98
		なし	あり	0.48
		あり	なし	0.52
87714	ブチル-アガロース生成物	あり	あり	0.41
		なし	あり	0.58
		あり	なし	0.52
		あり	あり	0.47

特開平1-250397(10)

- a. サンプルを尿素-DTT及びKSCNで処理する時は、尿素-DTT処理を常に先にやり、その次にKSCN処理を行なう。
- b. ED_{50} はマウスにおける50%の抗体陽転率を示す抗原量を μg で表わしたもの。
- c. KSCNは実施例2(a)記載のダイヤフィльтраション法の代わりにPBS(12,000 MWC0)で透析除去した。
- d. これらのサンプルは尿素-DTTで処理してからバイオゲルA-5mカラムのクロマトグラフィーにかけ不純物を除去してからマウスポテンシーテストに使用した物であり、以下の方法による。ブチルアガロース生成物サンプルを実施例2(a)記載の尿素-DTTで処理。抗原調製物を2mM DTTを含む2M尿素で平衡化しておいたバイオゲルA-5m(2.5×3.6cm)カラムにのせる。2mM DTTを含む2M尿素でカラムより溶出させ、単一AUSRIA陽性ピークを得る。このピーク画分をブールし透析バッグ(12,000 MWC0)に入れPBSで透析し、尿素-

DTT処理ロット8770.6を作成した。

e. この分画部分はブチルアガロース生成物を次の精製過程としてセファロース6Bにのセクロマトグラフィーを行なった時に OD_{280} の吸光度において高い吸収ピークを持つものである。

前文までの明細書は、説明を目的とした実施例をもって本発明の原理を示すものであるが、本発明の実施は、ここに記載されている過程や手順における、一般的な変法、適応、改良、省略あるいは追加操作などにより遂行される事はよく知られている所であり、特許請求の範囲の中で示されている。

平成11年3月28日

(1) 別紙の通り、明細書1通を提出致します。

平成11年3月28日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示 昭和63年特許願第268356号
2. 発明の名称 組換え体肝炎抗原の精製方法
3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国、ニュージャージー、ローウエイ、イースト リンカーン アヴェニュー 126

名 称 メルク エンド カムパニー
インコーポレーテッド

4. 代理人

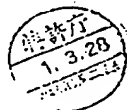
住 所 〒100 東京都千代田区丸の内2-2-1 富士ビル 602号室
電話 (213) 1561 (代)

氏 名 (644) 弁護士 岡 部 正 夫

5. 補正命令の日付 平成11年2月13日
(発送日：平成11年3月7日)

6. 補正の対象 「明 細 書」

7. 補正の内容 別紙のとおり
明細書の枠内内容に変更なし



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 01-250397

~ EP 314 240

(43)Date of publication of application : 05.10.1989

(51)Int.Cl.

C07K 3/00
A61K 39/29
C07K 3/12
C07K 15/04
C07K 15/14
C12P 21/00

(21)Application number : 63-268356

(71)Applicant : MERCK & CO INC

(22)Date of filing : 26.10.1988

(72)Inventor : SHIGEKO YAMAZAKI

(30)Priority

Priority number : 87 113583 Priority date : 26.10.1987 Priority country : US

(54) METHOD FOR PURIFYING RECOMBINANT HEPATITIS ANTIGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To industrially obtain favorably the antigens which are made soluble and useful for a vaccine against B-type hepatitis, etc., by treating the precipitation partial purification recombinant B hepatitis surface antigens with some amount of a modifier in the presence of a reducer and by removing thereafter the reducer and the modifier.

CONSTITUTION: After a precipitation partial purified recombinant B-type hepatitis antigen expressed in recombinant, or a preparation containing a part of the antigen, is treated with a some amount of a modifier (e.g. urea) in the presence of a reducer effective to make the said preparation soluble (e.g. dithiothreitol), the modifier and the reducer are removed by such means as a diafiltration, thereby obtaining the solubilized partial purified recombinant hepatitis antigen or the preparation containing a part of the said antigen. The prefd. final conc. of urea as a modifier is approx. 4 M and that of dithiothreitol as a reducer is approx. 5 mM respectively.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.